

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Karen Gruhn

**ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR MEDIADA PELA mTOR NO EFEITO TIPO-
ANTIDEPRESSIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM
CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2018

Karen Gruhn

**ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR MEDIADA PELA mTOR NO EFEITO TIPO-
ANTIDEPRESSIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do Grau
de Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Ana Lúcia
Severo Rodrigues

Coorientadora: MSc. Aline Siteneski

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Gruhn, Karen

ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR
MEDIADA PELA mTOR NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO
EXERCÍCIO FÍSICO EM CAMUNDONGOS / Karen Gruhn ;
orientador, Ana Lúcia Severo Rodrigues,
coorientador, Aline Siteneski, 2018.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Depressão. 3. Exercício
físico. 4. mTOR. I. Severo Rodrigues, Ana Lúcia. II.
Siteneski, Aline. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV.
Título.

Karen Gruhn

**ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR MEDIADA PELA mTOR NO EFEITO TIPO-
ANTIDEPRESSIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM
CAMUNDONGOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Bacharelada em Ciências Biológicas e aprovada
em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 22 de junho de 2018.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Severo Rodrigues
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Francis Leonardo Pazini
Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Gislaine Olescowicz
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores, direção e administração do CCB que sempre estiveram dispostos a ajudar e a contribuir para um melhor aprendizado, em especial a minha professora e orientadora Ana Lúcia Severo Rodrigues, pela compreensão, pelas suas sábias correções e incentivos, bem como a minha coorientadora Aline Siteneski por sempre estar ao meu lado me auxiliando a superar as dificuldades da pesquisa, pelo direcionamento à ciência e pelas suas contribuições valorosas. Agradeço aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da Depressão por sempre estarem solícitos a qualquer questionamento e a me incentivarem na ciência, especialmente a todos que contribuíram neste trabalho, a Andiará por me auxiliar no *Western Blotting*, a Priscila por sanar minhas dúvidas no decorrer da escrita deste trabalho, ao Francis pela disponibilidade em transmitir a qualquer momento seu conhecimento principalmente relacionado à bioestatística.

À UFSC por ter me dado a chance e todas as ferramentas que permitiram chegar hoje ao final desse ciclo de maneira satisfatória. Ao LAMEB por fornecer estrutura para o desenvolvimento com qualidade da pesquisa científica. Aos animais utilizados neste trabalho que deram suas vidas para o progresso científico, eles têm o meu respeito. Minha gratidão aos espaços que o curso de Ciências Biológicas me proporcionou, em especial à gestão de 2014/2015 da Simbiosis e ao PET Biologia.

Por último e não menos importante, agradeço aos meus pais, Suzana e Luiz Artur, e ao meu irmão, Andrei, que embora distantes fisicamente, sempre me apoiaram e confiaram em mim, encorajando-me a concretização de um grande passo à minha realização profissional. Ao meu namorado e melhor amigo, Pedro, pelo suporte na finalização desta etapa da minha vida. Aos meus amigos de perto e de longe que são os irmãos que escolhi. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”
(Albert Einstein)

RESUMO

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes na sociedade, causando incapacidade funcional dos indivíduos acometidos, sendo considerada um problema de saúde pública. Os efeitos benéficos promovidos pelo exercício físico sobre o sistema nervoso central (SNC) são bem reportados, sendo uma estratégia de baixo custo e fácil acesso na prevenção e no tratamento adjuvante da depressão. Contudo, não estão bem estabelecidos os mecanismos responsáveis pelo efeito antidepressivo do exercício físico, principalmente no que concerne às vias de sinalização intracelular que são ativadas pelo mesmo. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se 4 semanas de exercício físico de *endurance* realizado 5 vezes por semana com duração de 45 minutos cada sessão produz efeito tipo-antidepressivo e se este efeito depende da ativação da via de sinalização intracelular mediada pela proteína alvo mecanístico da rapamicina em mamíferos (mTOR). Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, as quais foram divididos em 4 grupos experimentais: a) grupo não exercitado no qual foi administrado veículo; b) grupo exercitado no qual foi administrado veículo; c) grupo não exercitado no qual foi administrado o inibidor seletivo da mTOR (rapamicina, 0,2 nmol/sítio, i.c.v.); d) grupo exercitado no qual foi administrado rapamicina. Após 14 minutos da administração da rapamicina e do veículo, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA) para avaliar possíveis alterações na atividade locomotora. Decorridos 4 minutos do TCA, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF), teste preditivo de atividade antidepressiva. Em seguida, foi retirado o córtex pré-frontal para detecção do imunoconteúdo das formas total e fosforilada de mTOR, bem como da proteína cinase *downstream* à mTOR, a p70S6K por *Western Blotting*. Não foram identificadas alterações nas atividades locomotoras nos grupos experimentais. Os animais submetidos ao exercício físico apresentaram uma redução do tempo de imobilidade em relação ao grupo não exercitado no TNF, o que caracteriza um comportamento tipo-antidepressivo, o qual foi prevenido pela administração da rapamicina. Os resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo neste protocolo de exercício físico está relacionado com a ativação da via de sinalização da mTOR, entretanto as análises bioquímicas por *Western Blotting* não detectaram alterações significativas na fosforilação de mTOR e p70S6K. Apesar da ausência de alterações bioquímicas nas condições experimentais utilizadas, os resultados comportamentais desse trabalho indicam que o efeito tipo-

antidepressivo do exercício físico de *endurance* pode envolver a ativação da via de sinalização intracelular mediada pela mTOR.

Palavras-chave: Depressão; Exercício físico; mTOR

ABSTRACT

Depression is one of the most prevalent psychiatric disorders in society, causing functional impairment in the affected individuals, being considered a public health problem. The beneficial effects promoted by physical exercise on the central nervous system (CNS) are well reported, being a low cost and easy access strategy for the prevention and adjuvant treatment of depression. However, the mechanisms responsible for the antidepressant effect of physical exercise are not well established, especially regarding the intracellular signaling pathways that are activated by it. Therefore, the purpose of this study was to investigate whether 4 weeks of endurance physical exercise performed 5 times a week with a duration of 45 minutes each session produces antidepressant-like effect and whether this effect depends on the activation of the intracellular signaling pathway mediated by the mechanistic target protein of mammalian rapamycin (mTOR). Female Swiss mice were used, which were divided into 4 experimental groups: a) non-exercised group administered with vehicle; b) exercised group administered with vehicle; c) non-exercised group administered with the selective mTOR inhibitor (rapamycin, 0.2 nmol/site, i.c.v); d) exercised group administered with rapamycin. After 14 minutes of the administration of the rapamycin or vehicle, mice were submitted to the open-field test (OFT) to evaluate possible locomotor alterations. After 4 minutes, animals were submitted to the forced swimming test (FST), a predictive test of antidepressant activity. The prefrontal cortex was immediately removed for detection of total and phosphorylated mTOR, as well its downstream protein kinase p70S6K by Western Blotting. No locomotor alterations were identified in the experimental groups. The animals submitted to physical exercise exhibited a reduction in the immobility time in relation to the non-exercised group in the FST, which characterizes an antidepressant-like behavior, which was prevented by the administration of rapamycin. Although we did not find any significant changes in the phosphorylation of mTOR and p70S6K in these experimental conditions, the behavioral results suggest that the antidepressant-like effect elicited by this exercise protocol is related to the activation of the mTOR signaling pathway.

Keywords: Depression; Physical exercise; mTOR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação da mTORC1: neurotransmissão e mecanismos de sinalização intracelular pela cetamina	21
Figura 2. Cronograma dos protocolos experimentais	27
Figura 3. Representação do teste do nado forçado (TNF)	28
Figura 4. Representação do teste do campo aberto (TCA).....	29
Figura 5. Reversão do efeito tipo-antidepressivo do exercício físico no TNF pela administração de rapamicina	32
Figura 6. Efeito do exercício físico na atividade locomotora (número de cruzamentos) no TCA em animais exercitados e não exercitados tratados com veículo ou com rapamicina	33
Figura 7. Efeito do exercício físico e da administração de rapamicina na fosforilação de mTOR (Ser ²⁴⁴⁸) no córtex pré-frontal	34
Figura 8. Efeito do exercício físico e da administração de rapamicina na fosforilação de p70S6K (Thr ³⁸⁹) no córtex pré-frontal.....	35
Figura 9. Ativação da mTORC1: neurotransmissão e mecanismos de sinalização celular por ativação de CREB, observados em resposta ao tratamento crônico	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT₂ – Receptor monoaminérgico de serotonina do subtipo 2
5-HT₄ – Receptor monoaminérgico de serotonina do subtipo 4
5-HT₆ – Receptor monoaminérgico de serotonina do subtipo 6
5-HT₇ – Receptor monoaminérgico de serotonina do subtipo 7
 α AR – Receptor adrenérgico do subtipo α
 β AR – Receptor adrenérgico do subtipo β
4E-BPs – Proteínas ligantes de 4E
AC – Adenilil ciclase
Akt – Proteína cinase B
AMPA – Ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de variância
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BrdU – Bromodesoxiuridina
CAMK-II – Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina
CA1, CA2, CA3 – Áreas hipocâmpais do *Cornu Ammonis*
CCDV – Canais de cálcio dependentes de voltagem
CEUA – Comitê de ética no uso de animais
CREB – Proteína de ligação ao elemento AMPc
DMSO – Dimetilsulfóxido
D.O. – Densidade óptica
DSM-5 – Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais 5
eEF2K – Proteína cinase de fator de alongamento eucariótico 2
eIF4E – Fator de iniciação eucariótico 4E
E.P.M. – Erro padrão da média
ERK – Proteína cinase regulada por sinalização extracelular
FKBP12 – Proteína de ligação a FK506 12
GABA – Ácido gama aminobutírico
GD – Giro denteado
GluA1 – Subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA
i.c.v – Intracerebroventricular
iMAO – Inibidores da monoamina oxidase
ISR – Substratos de receptor de insulina
ISRN – Inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina
mTOR – Proteína alvo mecanístico da rapamicina
mTORC1 – Complexo 1 do alvo mecanístico da rapamicina
NMDA – N-metil-D-aspartato
p70S6K – Proteína ribossomal S6 cinase

PDK1 – Proteína cinase dependente de fosfatidilinositídio 1
PI3K – Fosfatidilinositol 3'-cinase
PKA – Proteína cinase A
PP2A – Proteína fosfatase 2A
Proteína G – Proteínas de ligação GTP
PSD95 – Proteína de densidade pós-sináptica de 95kDa
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
Ro 25-6981 – Antagonistas de receptores de NMDA
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SNC – Sistema nervoso central
TBS – Tampão Tris-salina
TBS-T – Tampão Tris-salina-Tween
TCA – Teste do campo aberto
TDM – Transtorno Depressivo Maior
TNF – Teste de nado forçado
TrkB – Receptor tropomiosina cinase B
VO₂ – Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 DEPRESSÃO	14
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO	16
1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E DEPRESSÃO	17
1.4 VIAS GLUTAMATÉRGICAS NA DEPRESSÃO E NO EXERCÍCIO FÍSICO	19
2. JUSTIFICATIVA	22
3. HIPÓTESE	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. METODOLOGIA.....	26
5.1 ANIMAIS	26
5.2 EXERCÍCIO AERÓBIO	26
5.3 AGENTES FARMACOLÓGICOS	27
5.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	28
5.4.1 <i>Teste do nado forçado (TNF)</i>	28
5.4.2 <i>Teste do campo aberto (TCA)</i>	29
5.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA	29
5.5.1 <i>Preparação do tecido</i>	29
5.5.2 <i>Western Blotting</i>	30
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6. RESULTADOS	32
6.1 COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO.....	32
6.2 ATIVIDADE LOCOMOTORA	32
6.3 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	33
6.3.1 <i>Imunodeteção de mTOR no córtex pré-frontal</i>	33
6.3.2 <i>Imunodeteção de p70S6K no córtex pré-frontal</i>	34
7. DISCUSSÃO	36
8. CONCLUSÃO.....	42
9. PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

O transtorno depressivo maior (TDM), que neste trabalho será tratado como depressão, é caracterizado comumente pela presença de alterações no humor, assim como alterações somáticas e cognitivas que geram uma significativa redução na capacidade funcional do indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A depressão é considerada um grave problema de saúde pública (NESTLER e CARLEZON, 2006), por exemplo, no Brasil, estima-se que 10,4% da população apresentou depressão em um período de 12 meses (OTTE et al., 2016). Além disso, a prevalência ao longo da vida desse transtorno no Brasil corresponde à aproximadamente 17% da população (SILVA et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a depressão acomete aproximadamente 322 milhões de pessoas no mundo inteiro (WHO, 2017). Em 2010, um levantamento realizado pela *Global Burden of Disease Study* revelou a prevalência da depressão na América do Sul de 16,5% (BAXTER et al., 2013). A nível mundial, estima-se que ao longo da vida um em cada seis adultos desenvolvem esse transtorno de humor (OTTE et al., 2016).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5 (DSM-5), a depressão pode apresentar os seguintes sintomas: humor deprimido, anedonia, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersônia, agitação ou retardo motor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessivos ou inapropriados, capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, indecisão, pensamentos recorrentes de morte e ideação suicida. O diagnóstico da depressão é realizado quando o indivíduo apresenta cinco ou mais destes sintomas e pelo menos um dos seguintes sintomas: humor deprimido ou anedonia, durante um período mínimo de duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A depressão, bem como outros transtornos de humor, possivelmente reflete múltiplas alterações fisiopatológicas, o que leva a diversos sintomas (LOFTIS et al., 2010). Estudos *post mortem* (DREVETS, 2001) e de neuroimagem (DREVETS, 2001; SHELIN, 2003) revelam uma diminuição do volume da massa cinzenta e da densidade glial no hipocampo e no córtex pré-frontal de pacientes com depressão. Assim, esse caráter heterogêneo da depressão é decorrente do

envolvimento de várias regiões cerebrais na fisiopatologia deste transtorno, bem como reflete, pelo menos em parte, os vários sintomas depressivos (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

A etiologia da depressão ainda não está bem estabelecida, contudo a deficiência na atividade monoaminérgica no encéfalo tornou-se amplamente reconhecida por levar a quadros depressivos (ELHWUEGI, 2004). Na década de 50, a hipótese monoaminérgica da depressão foi postulada a partir da observação de pacientes medicados para o tratamento de hipertensão com o fármaco reserpina, os quais passaram a apresentar sintomas depressivos (FREIS, 1954). Posteriormente, foi demonstrada a diminuição das monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) na fenda sináptica pela atuação da reserpina sobre os transportadores vesiculares de monoaminas, o que gera sintomas depressivos, assim sugerindo que a deficiência da atividade monoaminérgica leva à depressão e o tratamento estaria associado ao restabelecimento dessa atividade (SCHILDKRAUT, 1965).

O tratamento farmacológico da depressão tem se baseado no aumento da concentração das monoaminas na fenda sináptica (NEMEROFF, 2007; PRINS et al., 2011) e este aumento se deve ou ao bloqueio dos transportadores de monoaminas (promovido por inibidores de recaptação de monoaminas) ou à inibição da degradação enzimática das monoaminas através fármacos que inibem a atividade da enzima monoamina oxidase (PRINS et al., 2011).

Embora o aumento da concentração sináptica de monoaminas ocorra agudamente após a administração dos fármacos antidepressivos monoaminérgicos, a remissão dos sintomas depressivos ocorre apenas de 3 a 5 semanas após o início do tratamento (WONG e LICINIO, 2001; BERTON e NESTLER, 2006). Este fato, leva a crer que a neurotransmissão monoaminérgica *per se* não é totalmente responsável pelos resultados obtidos na clínica (NESTLER et al., 2002).

Em decorrência das limitações da hipótese monoaminérgica, principalmente no que diz respeito ao tempo para produzir os efeitos terapêuticos, novas hipóteses foram postuladas na tentativa de explicar os mecanismos fisiopatológicos associados à depressão (NESTLER et al., 2002). Neste sentido, destaca-se a hipótese neurotrófica da depressão que postula que os sintomas depressivos estão relacionados a um prejuízo nos mecanismos de plasticidade sináptica, particularmente uma redução nos níveis de fatores neurotróficos no hipocampo e córtex pré-frontal. A redução nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) nestas regiões encefálicas está bem caracterizada em animais submetidos ao estresse crônico, um modelo animal de depressão (DUMAN e

MONTEGGIA, 2006). O tratamento crônico com fármacos antidepressivos, assim como outras estratégias antidepressivas não farmacológicas, como o exercício físico, restabelece as alterações neuroquímicas e comportamentais nestes animais (RUSSO-NEUSTADT et al., 1999, 2004; ADLARD et al., 2004).

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO

Segundo Caspersen et al. (1985), o exercício físico pode ser definido como qualquer atividade física, planejada, estruturada e repetitiva que tem por objetivo melhorar ou a manter a aptidão física. Os exercícios físicos podem ser aeróbios, os quais movimentam grandes grupamentos musculares com alternância na contração e relaxamento, como por exemplo, caminhar, correr, nadar, entre outros; ou exercícios anaeróbios, nos quais ocorre uma rigorosa contração dos músculos juntamente com alongamento, dentre eles há o levantamento de peso e o treinamento resistido, comumente chamado de musculação; e ainda há os exercícios de flexibilidade (SIDDQUI et al., 2010). Além disso, o exercício físico aeróbio pode ser definido como exercício de *endurance*, sendo caracterizado pela capacidade de realizar movimento em grandes grupos musculares esqueléticos em intensidades moderadas a altas por longos períodos de tempo (PATE e KRISKA, 1984; MORICI et al., 2016).

A partir do exercício físico de intensidade moderada há uma demanda do consumo de O_2 pulmonar (VO_2) (WHIPP, 1994; JOYNER e COYLE, 2008). Este VO_2 é regulado pela capacidade máxima dos sistemas pulmonar e cardiovascular em capturar e transportar oxigênio, assim como é regulado pela habilidade do O_2 ser utilizado pelos tecidos na oxidação de substratos energéticos (GAESSER e POOLE, 1996; MORICI et al., 2016). Outras adaptações celulares são observadas nas células musculares em decorrência de exercícios de intensidade moderada a alta, como aumento na remoção do lactato sanguíneo e modificações no pH (GAESSER e POOLE, 1996; MORICI et al., 2016) e também aumento da temperatura muscular (SAHLIN, 2005).

O hábito de realizar exercício físico regularmente gera muitos benefícios (SIDDQUI et al., 2010; FEBBRAIO, 2016), quando acompanhado por estilo de vida saudável, melhora o funcionamento do sistema cardiovascular, reduz o risco de doenças coronarianas, diabetes, osteoporose e câncer e também promove a manutenção do peso corporal. Ainda de acordo com a idade do indivíduo, o exercício favorece a estabilidade dinâmica e preserva a capacidade funcional, resultando em

bem-estar físico e psicológico (CHODZKO-ZAJKO et al., 2009; HÖTTING et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que o exercício físico é capaz de gerar efeitos benéficos ao sistema nervoso central (SNC) (ERICKSON et al., 2011; GRIFFIN et al., 2011; LIU e NUSSLOCK, 2018). Em indivíduos idosos ativos que praticaram exercícios físicos durante a vida, têm se observado um menor risco em desenvolver doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (PARDON, 2011), sendo considerado uma estratégia para prevenir o desenvolvimento desta doença (SUN et al., 2018).

O exercício físico de intensidade moderada é capaz de aprimorar a memória espacial de camundongos (SO et al., 2017) e estimular a neuroplasticidade no hipocampo de ratos (INOUE et al., 2015), sendo estes efeitos associados à prevenção da neurodegeneração (ERICKSON et al., 2011, 2012; LIU e NUSSLOCK, 2018). Além disso, a produção do BDNF induzida pelo exercício físico é encontrada em áreas límbicas relacionadas à depressão, como o hipocampo (ERICKSON et al., 2011; LAWSON et al., 2014) e o córtex cerebral (AKSU et al., 2012; MUSUMECI et al., 2015). Em vista disso, é reportada que a produção de BDNF induzida pelo exercício físico aumenta a neurogênese hipocampal e desempenha um papel chave nos efeitos cognitivos positivos produzidos pelo exercício físico (ERICKSON et al., 2011; LAWSON et al., 2014; PIETRELLI et al., 2018). Ainda, tem sido demonstrado que o exercício físico tem a capacidade de promover neurogênese, melhorar o desempenho cognitivo e estimular a liberação de BDNF mediada pela indução da liberação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (FOSTER, et al., 2011; LAWSON et al., 2014).

Dessa maneira, é demonstrado que a prática de exercícios físicos está atrelada a efeitos neuroprotetores, o que pode ser observado tanto em modelos animais (BERNARDI et al., 2013), quanto em humanos por meio de técnicas de neuroimagem (ERICKSON et al., 2011).

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E DEPRESSÃO

O exercício físico tem sido objeto de estudo mais intenso nas últimas três décadas como uma forma de prevenção e de tratamento alternativo para a depressão (PERRATON et al., 2010). A combinação de exercício físico com outros tratamentos é recomendada devido à melhora dos sintomas depressivos (DALEY, 2008). Ainda, recentes revisões documentam que o exercício possui um papel integrador no tratamento clínico da depressão, assim considerando o exercício como uma

importante ferramenta na intervenção adjunta ao tratamento clínico (STATHOPOULOU et al., 2006; BLUMENTHAL et al., 2007; ARCHER et al., 2014).

Os efeitos antidepressivos do exercício físico podem estar relacionados com a ativação de determinadas vias de sinalização intracelulares. Muitos estudos sugerem que esse efeito pode ser mediado pelo BDNF (ERICKSON et al., 2012; HEYMAN et al., 2012; HÖTTING et al., 2016). A atividade física em roda de corrida voluntária potencializou o efeito da reboxetina, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina (ISRN), em aumentar o conteúdo de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) de BDNF em algumas regiões hipocampais em ratos (RUSSO-NEUSTADT et al., 2004). Um efeito semelhante ocorreu quando foi realizada a administração de antidepressivos tricíclicos como a imipramina e inibidores da monoamina oxidase (iMAO) como o tranilcipromina (RUSSO-NEUSTADT et al., 1999). Um estudo de Engesser-Cesar et al. (2007) mostrou que camundongos submetidos ao exercício físico aeróbio juntamente ao tratamento com fluoxetina apresentaram aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, associado a um efeito tipo-antidepressivo de maior intensidade quando comparado aqueles submetidos somente ao exercício ou somente ao tratamento com o fármaco. Além disso, um estudo clínico realizado com pacientes que já tiveram depressão e que praticavam exercícios físicos aeróbios regularmente mostrou que estes eram menos propensos a ter novos episódios depressivos (LETT et al., 2005).

Os antidepressivos utilizados atualmente no tratamento da depressão agem favorecendo a neurogênese, que pode ser definida como um aumento da proliferação neuronal, diferenciação e aumento do número de neurônios no hipocampo do encéfalo adulto (MALBERG et al., 2000). Sabe-se que o exercício físico, de forma semelhante aos antidepressivos, induz à neurogênese hipocampal, aumentando, desta forma, a plasticidade hipocampal (VAN PRAAG et al., 1999; ENGESSER-CESAR, et al., 2007). Estudos mostram que a atividade física na roda de corrida voluntária provoca um aumento na neurogênese do giro denteado (GD) da formação hipocampal (LIU e NUSSLOCK, 2018). A utilização de bromodesoxiuridina (BrdU) como marcador molecular mostra que além do aumento da proliferação de células progenitoras na zona subgranular do GD, a taxa de sobrevivência aumentava a medida que estas células se diferenciavam e amadureciam em animais exercitados (VAN PRAAG et al., 1999). Assim, considera-se que o exercício físico promove a neurogênese hipocampal, e o BDNF tem

sido proposto como o responsável por exercer significativamente esses efeitos benéficos no SNC.

1.4 VIAS GLUTAMATÉRGICAS NA DEPRESSÃO E NO EXERCÍCIO FÍSICO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório amplamente distribuído no sistema nervoso de mamíferos. Este participa de diversas funções do sistema nervoso, desde a migração neuronal, diferenciação e formação e eliminação de sinapses (OSIKOWICZ et al., 2013). A partir da sua liberação na fenda sináptica, o glutamato pode se ligar aos receptores ionotrópicos ou metabotrópicos. Dentre os receptores ionotrópicos, os quais são canais iônicos permeáveis a cátions, há três subgrupos desses receptores, sendo: ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), cainato e receptores do tipo ácido *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (MELDRUM, 2000). Os receptores metabotrópicos são acoplados a proteínas de ligação GTP (proteínas G) e atuam ou pela produção de mensageiros secundários no citoplasma ou ainda podem influenciar na atividade dos canais iônicos da membrana da célula por interagirem com a proteína G (PURVES et al., 2010).

A ativação dos receptores do subtipo AMPA leva ao influxo de íons, sendo neste caso íons sódio, causando despolarização e a consequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), permitindo a liberação de vesículas contendo BDNF (DUMAN et al., 2000; SHELTON, 2007). Estes eventos ocorrem de forma rápida e levam à sinaptogênese, ao contrário da neurogênese que é um evento que ocorre a longo prazo e envolve síntese de BDNF (GONÇALVES et al., 2016). O aumento de BDNF na fenda sináptica está relacionado com a sobrevivência neuronal e desempenha um papel importante no mecanismo de ação dos antidepressivos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006).

O aumento do BDNF leva à estimulação do complexo 1 da mTOR (proteína alvo mecanístico da rapamicina) (mTORC1). Este complexo, quando fosforilado, permite a regulação da plasticidade sináptica, através da síntese de proteínas relacionadas à sinaptogênese, como a sinapsina, subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA (GluA1), proteínas de ancoragem, como as proteínas de densidade pós-sináptica de 95 kDa (PSD95) e, inclusive, atua na inserção das mesmas na membrana (DUMAN et al., 2012; DUMAN e VOLETI, 2012). A mTOR é a principal proteína do complexo com atividade serina-treonina

cinase, juntamente com proteínas como PRAS40, SEC13, DEPTOR e RAPTOR (LOEWITH et al., 2002).

Estudos mostram que alguns antagonistas de receptores NMDA, como a cetamina, produzem um efeito antidepressivo rápido pela ativação do complexo mTORC1 (LI et al., 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Uma única e baixa dose de cetamina é capaz de abolir comportamento tipo-depressivo em modelos animais, sendo este efeito mediado por uma rápida ativação da mTOR no córtex pré-frontal (LI et al., 2010). Além disso, estudos clínicos têm reportado o efeito antidepressivo rápido e sustentado da cetamina em pacientes com depressão refratária a tratamentos convencionais com fármacos antidepressivos (BERMAN et al., 2000). Assim, é postulado que o efeito terapêutico da cetamina é dependente da estimulação da plasticidade sináptica com a participação da via de sinalização intracelular da mTOR.

A Figura 1 mostra que a ativação do complexo mTORC1 está associada a uma complexa cascata de sinalização intracelular. A partir da liberação de BDNF na fenda sináptica por vesículas que se situam no neurônio pós-sináptico, os receptores tropomiosina cinase B (TrkB) são ativados. Estes receptores estando fosforilados permitem o acoplamento e fosforilação dos substratos de receptor de insulina (ISR), que levará a fosforilação da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e proteína cinase dependente de fosfatidilinositídeo 1 (PDK1) (DUMAN et al., 2012; DUMAN e VOLETI, 2012; DUMAN e LI, 2012). Subsequentemente, a proteína cinase B (PKB) nomeada como Akt desencadeará a estimulação do complexo mTORC1 (LI et al., 2010; DUMAN e LI, 2012; DUMAN e VOLETI, 2012). Esse complexo também pode ser ativado pela via da proteína cinase regulada por sinalização extracelular (ERK) (HOEFFER e KLANN, 2010). Estudos reportam que a ativação da via ERK pode ter um efeito protetor na neurodegeneração hipocampal e, ainda, quando esta via é ativada pelo aumento do BDNF poderia estimular cinases e fatores de transcrição levando à neuroproteção (LEE et al., 2016). Além disso, dados na literatura mostram que inibidores da via PI3K/Akt (LY294002) ou MEK/ERK (UO126) foram capazes de bloquear os efeitos da cetamina sobre a fosforilação da mTORC1 (LI et al., 2010).

Os efeitos associados a fosforilação do complexo mTORC1 são a fosforilação da proteína ribossomal S6 cinase (p70S6K) que leva a inibição da proteína cinase de fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2K), resultando no aumento de tradução de proteínas sinápticas (DUMAN e VOLETI, 2012). Adicionalmente, a proteína ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BPs) também é fosforilada pela mTORC1, consequentemente se torna inativa no sentido de reprimir a

tradução, pois resulta na liberação do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) que causa aumento da tradução de proteínas sinápticas (DUMAN et al., 2012).

Portanto, é possível que a sinalização desencadeada pela ativação da mTOR represente um alvo importante responsável pelos benefícios causados pelo exercício físico (LLOYD et al., 2017). Assim, a ativação da mTOR pode ser um alvo comum dos efeitos benéficos do exercício físico sobre a neuroplasticidade e sobre a modulação do humor.

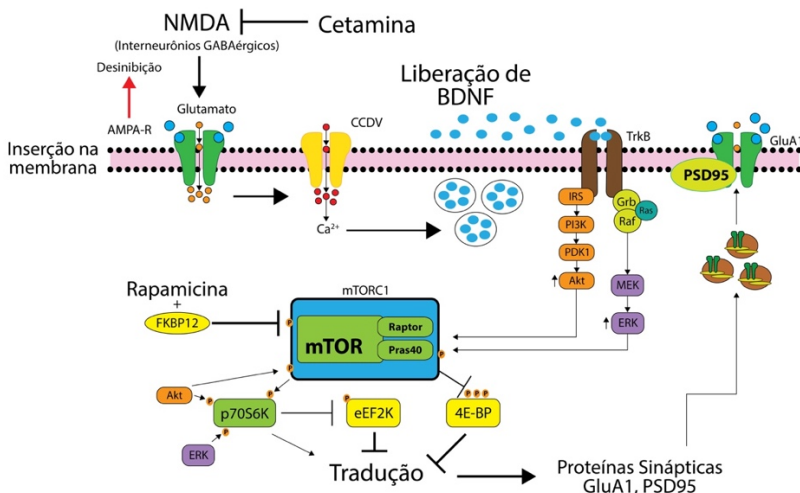


Figura 1. Ativação da mTORC1: neurotransmissão e mecanismos de sinalização intracelular pela cetamina. A rápida ação antidepressiva da cetamina ocorre pelo mecanismo ilustrado acima. Os receptores NMDA nos interneurônios GABAérgicos (ácido gama-aminobutírico) e nos neurônios pós-sinápticos são inibidos pela cetamina, aumentando os níveis de glutamato, seguido de uma ativação dos receptores AMPA e canais de cálcio dependente de voltagem. O influxo de cálcio decorrente da ativação destes canais leva a liberação de BDNF de vesículas, acarretando um aumento de BDNF na fenda sináptica. Consequentemente, o BDNF estimula os receptores TrkB que ativa a via PI3K/Akt e MEK/ERK, que fosforila o complexo mTORC1. Uma vez ativado, este complexo estimula cinases, como a p70S6K, bem como a 4E-BP1, que possuem papel fundamental relacionado à sinaptogênese, por regularem a síntese de proteínas sinápticas como GluA1 e PSD95. Fonte: Adaptado de DUMAN et al., 2012.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o último levantamento realizado pela *Global Burden of Disease Study*, a depressão é um transtorno psiquiátrico que causa incapacidade funcional nos indivíduos. Este transtorno é bastante prevalente na população, acometendo cerca de 16,5% dos indivíduos em algum momento ao longo da vida na América do Sul (BAXTER et al., 2013). Mundialmente, um em cada seis adultos desenvolvem esse transtorno de humor (OTTE et al., 2016), sendo considerado um problema de saúde pública. Os diversos fatores que podem influenciar na depressão ainda estão sendo estudados, embora este transtorno de humor seja considerado heterogêneo e multifatorial (SHEN, 2016) e com forte impacto socioeconômico (OLESEN et al., 2012). Além disso, o tratamento antidepressivo farmacológico proporciona uma limitada eficácia e efeitos adversos, fatores que reduzem a adesão ao tratamento (BERTON e NESTLER, 2006). Assim, a busca por ferramentas que ofereçam um tratamento alternativo à depressão ou que sejam terapias concomitantes é uma tarefa de suma importância.

O exercício físico, além de gerar muitos benefícios à saúde daqueles que o praticam regularmente (SIDDIQUI et al., 2010), proporciona efeitos significativos no tratamento da depressão (PERRATON et al., 2010). Estudos clínicos reportam a remissão dos sintomas depressivos, quando o exercício é aliado com o tratamento convencional (ENGESSER-CESAR et al., 2007; DALEY, 2008). Além disso, pacientes que já foram acometidos pela depressão e que têm o hábito de exercitar-se regularmente parecem ser menos propensos a desenvolver novos episódios deste transtorno de humor (LETT et al., 2005).

Apesar de estar estabelecido que o exercício físico proporciona efeitos significativos no tratamento da depressão (PERRATON et al., 2010), as vias de sinalização intracelular envolvidas neste processo ainda não foram bem esclarecidas. Um recente estudo reporta que a via mTOR está relacionada à depressão, favorecendo a plasticidade e a sobrevivência neuronal (LLOYD, 2017). Dados da literatura mostram que o complexo mTOR, além de permitir a regulação e a síntese de proteínas sinápticas que favorecem a sobrevivência neuronal, é importante na regulação de fatores tróficos como por exemplo o BDNF (DUMAN et al., 2012). Neste enfoque, acredita-se que a sinalização mediada pelo complexo mTOR possa ser um alvo do exercício físico, sendo responsável pelo menos em

parte pelos efeitos benéficos gerados por ele na neuroplasticidade e modulação do humor (LLOYD et al., 2017).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento da via de sinalização mTOR, nos efeitos benéficos produzidos pelo exercício físico em testes preditivos de ação antidepressiva.

3. HIPÓTESE

Os benefícios do exercício físico em testes preditivos de ação antidepressiva estão relacionados à ativação da via de sinalização mTOR em camundongos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da via de sinalização intracelular mediada pela mTOR no efeito tipo-antidepressivo induzido pela prática de exercícios físicos aeróbios em camundongos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento de camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio no teste do nado forçado (TNF) um teste preditivo de ação antidepressiva.
- Investigar a influência da inibição farmacológica da mTOR sobre o efeito tipo-antidepressivo do protocolo de exercício físico aeróbio.
- Determinar o imunoconteúdo das proteínas mTOR e p70S6K (forma total e fosforilada) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbio.

5. METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo 4871200317. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas pesando entre 35 e 40 g com idade entre 45 e 60 dias que foram mantidos sob temperatura entre $20^{\circ}\text{C} \pm 22^{\circ}\text{C}$ e sob ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 7h:00min). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e permaneceram no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica até o término dos experimentos. Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 32 x 17 cm) e com acesso à água e à ração livre.

A utilização de fêmeas neste projeto é devido ao fato de vários estudos demonstrarem que fêmeas de roedores são mais suscetíveis aos transtornos de humor como a depressão, e sabe-se que a depressão é mais prevalente em mulheres (SEEDAT et al., 2009).

5.2 EXERCÍCIO AERÓBIO

Os camundongos foram divididos em dois grupos: exercitados e não exercitados. Ambos os grupos foram submetidos a um treino de adaptação, o qual permaneceram sobre a esteira desligada por 45 minutos em cinco sessões durante o período de uma semana, com o intuito de minimizar o efeito do estresse em decorrência da mudança de ambiente da caixa de alocação para a esteira de corrida. Nestes experimentos, utilizou-se uma esteira apropriada para camundongos (Insight, modelo EP 132). Após o treino de adaptação, os animais foram submetidos a uma triagem na qual a esteira foi ligada na velocidade de 16 m/min e os melhores corredores foram selecionados para o grupo experimental exercitado ($n= 7-8$) na esteira de corrida. Este grupo foi submetido ao treinamento de *endurance* na esteira de corrida. O exercício físico compreendeu um período de 4 semanas (28 dias) na frequência de cinco vezes por semana em intensidade progressiva (inicial de 8 m/min, aumentando 2 m/min por semana). O período de 4 semanas é necessário pela caracterização do efeito antidepressivo crônico do exercício (DUMAN et al., 2008). Este protocolo de exercício aeróbio é baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (dados não publicados).

5.3 AGENTES FARMACOLÓGICOS

Foi administrado via intracerebroventricular (i.c.v.) rapamicina (inibidor seletivo da mTORC1) (Sigma Chemical Co., St Louis, Estados Unidos) na dose de 0,2 nmol/sítio, i.c.v. O volume administrado por via i.c.v. foi 3 μ L. A rapamicina foi dissolvida com dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. Os grupos veículo foram administrados via i.c.v. com salina (NaCl 0,9%) em DMSO 100% para eliminar qualquer interferência desse solvente nos parâmetros comportamentais e bioquímicos analisados.

O procedimento de administração via i.c.v. ocorreu 24 horas após a última sessão de exercício físico no 28º dia. Os animais foram anestesiados por inalação com um algodão embebido em isoflurano por cerca de 15 segundos. Após estarem anestesiados, foi utilizado uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa de Hamilton de 25 μ L. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio diretamente no ventrículo lateral, utilizando-se o bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). Com a finalidade de verificar a precisão da injeção, os animais foram analisados macroscopicamente após a dissecação. Os animais que apresentaram indícios de hemorragia e/ou coágulo, ou que não indicaram que o procedimento foi realizado com sucesso, foram excluídos das análises (KASTER et al., 2012). As concentrações dos agentes utilizados neste experimento e protocolo são baseadas em estudos do nosso grupo (BROCARDO et al., 2008; BETTIO et al., 2012; CUNHA et al., 2012). A Figura 2 representa um esquema do protocolo experimental adotado nesse trabalho.

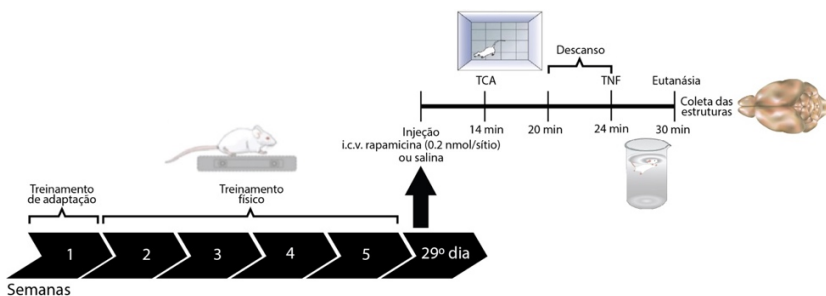


Figura 2. Cronograma dos protocolos experimentais. Os animais, inicialmente, foram submetidos ao treinamento de adaptação por 1 semana e, então, a partir da 2ª semana os grupos exercitados passaram a treinar por 4 semanas (28 dias). Após 24 horas, no 29º dia os grupos receberam injeção

i.c.v. de rapamicina (0,2 nmol/sítio) ou salina. Decorridos 14 min os animais foram submetidos ao TCA e, 4 minutos depois, foram submetidos ao TNF, sendo realizado em seguida a eutanásia dos animais e a coleta do córtex pré-frontal para análises bioquímicas. Fonte: Autor.

5.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais, bem como os procedimentos bioquímicos, foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Depressão (sala 204C), CCB, UFSC. Todas as atividades envolvendo os animais compreenderam o período entre às 9h e 17h.

5.4.1 Teste do nado forçado (TNF)

Neste teste preditivo, os camundongos foram submetidos a uma situação de estresse inescapável em exposição ao nado forçado. Os animais apresentam movimentos vigorosos como tentativa de fuga e posteriormente adotam uma postura quase imóvel, o que é considerado um estado de desespero comportamental (PORSOLT et al., 1977). Para a realização do teste, os camundongos foram colocados em tubos cilíndricos plásticos contendo aproximadamente 30 cm de água com temperatura média de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ (Figura 3). Os testes foram realizados individualmente com duração total de 6 minutos. O parâmetro avaliado neste teste é o tempo de imobilidade, sendo que um aumento deste tempo indica um comportamento tipo-depressivo, enquanto que fármacos antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade (PORSOLT et al., 1977).



Figura 3. Representação do teste do nado forçado (TNF). Fonte: Adaptado de DataBase Center for Life Science (DBCLS).

5.4.2 Teste do campo aberto (TCA)

Nesse teste, como ilustra a Figura 4, os camundongos foram submetidos em uma caixa de madeira (40 x 60 x 50 cm), sendo esta marcada com divisões de 12 quadrantes iguais (HALL, 1936). Foi registrado o número de quadrantes cruzados pelo animal com todas as patas. O número de quadrantes cruzados é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora (HALL, 1936; RODRIGUES et al., 1996). O teste tem duração total de 6 minutos.

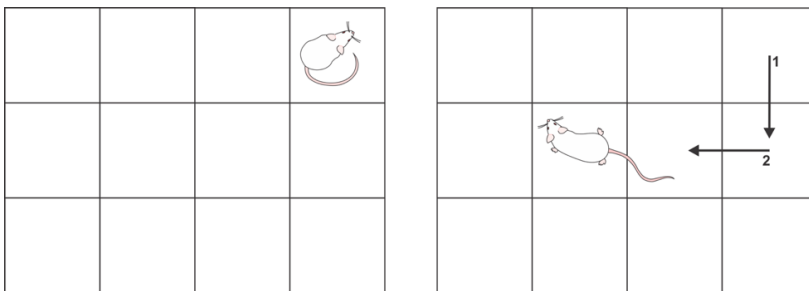


Figura 4. Representação do teste do campo aberto (TCA). Fonte: Imagem cedida por Agatha Oliveira.

5.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

5.5.1 Preparação do tecido

Após os testes comportamentais, os animais foram imediatamente eutanasiados para dissecação do córtex pré-frontal, e este tecido foi conservado a -80°C até o seu uso. As amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente por Oliveira et al. (2008). Cada amostra foi homogeneizada mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na_3VO_4 2 mM, Triton X- 100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases). Os tecidos lisados foram centrifugados ($10.000 \times g$ por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante foi diluído 1/1 (v/v) em solução composta de Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 8% e aquecido a 100°C por 5 min. A partir disso, uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. O restante da amostra foi diluído em glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8 em uma proporção de 1:4 (v/v) e β -mercaptoetanol de concentração final de 8% foi adicionado na amostra. Para estimar o

conteúdo das proteínas, foi realizada uma curva padrão com albumina de soro bovino (PETERSON, 1977).

5.5.2 *Western Blotting*

A fim de avaliar o imunoconteúdo das amostras, foi executado o *Western Blotting* descrito previamente por Leal et al. (2002). A etapa que compreende a eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de concentração 10% de acrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A quantidade proteínas por poço foi de 30 µg de proteína total/poço de cada amostra. Após a separação das proteínas, estas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através de um aparelho semi-dry (1,2 mA/cm² durante 1,5 h), e coradas com Ponceau 0,5%.

Posteriormente a esta etapa, as membranas foram bloqueadas durante 1 h com leite em pó desnatado 5% em tampão Tris-salina 5% (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Para detectar o imunoconteúdo da forma total e fosforilada da mTOR foram usados anticorpos específicos da Cell Signaling® anti-mTOR e anti-fosfo-mTOR (Ser²⁴⁴⁸), diluídos também em tampão Tris-salina-Tween (TBS-T) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) contendo albumina de soro bovino na diluição 1:1000. Para detectar o imunoconteúdo da forma total e fosforilada da p70S6K cinase (Thr³⁸⁹) foram usados anticorpos específicos da Cell Signaling® anti-p70S6K e anti-fosfo-p70S6K cinase (Thr³⁸⁹), diluídos em TBS-T contendo albumina de soro bovino na diluição 1:1000. As membranas foram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia subsequente, para a detectar os complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário da Cell Signaling® anti-IgG de coelho para conjugado com peroxidase (1:5000) em temperatura ambiente. A detecção das proteínas imunorreativas foi através do sistema de quimioluminescência (ECL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) com o uso do aparelho Chemidoc Bio-Rad® de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). A análise semi-quantitativa das bandas reativas foi avaliada pelo programa Image Lab software® 4.1 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) e os resultados foram expressos pela razão entre a densidade óptica (D.O.) da proteína fosforilada / D.O. da proteína total (LEAL et al., 2002).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 7.0 StatSoft. Inc.® e os gráficos foram gerados através do GraphPad Prism® 6.01. Os dados obtidos foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados comportamentais foram expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos das análises por *Western Blotting* foram expressos pela razão entre a D.O. da proteína fosforilada / D.O. da proteína total + E.P.M.

6. RESULTADOS

6.1 COMPORTAMENTO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO

Os resultados da Figura 5 permitem inferir um possível envolvimento da mTORC1 no efeito tipo-antidepressivo do exercício físico. A ANOVA de duas vias revelou uma alteração significativa do exercício [$F(1,22) = 9,50$ $p < 0,01$], da administração de rapamicina [$F(1,22) = 20,48$ $p < 0,01$] e da interação entre exercício e administração de rapamicina [$F(1,22) = 7,57$ $p < 0,01$]. A análise *post-hoc* demonstrou que os animais exercitados *per se* obtiveram uma redução no tempo da imobilidade no TNF, comparado aos animais do grupo veículo ($p < 0,01$), contudo esse efeito foi revertido pela administração da rapamicina ($p < 0,01$).

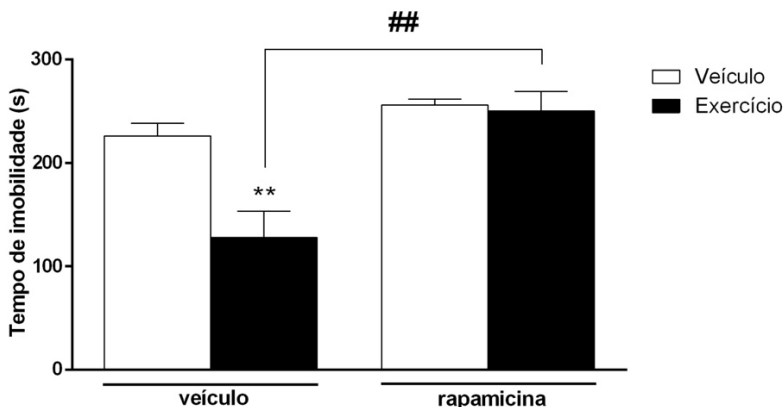


Figura 5. Reversão do efeito tipo-antidepressivo do exercício físico no TNF pela administração de rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.). Os valores estão expressos como média + E.P.M., $n = 6-7$. Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Newman Keuls. $**p < 0,01$ para grupo veículo exercitado comparado ao grupo veículo não exercitado, $##p < 0,01$ para grupo exercitado tratado com rapamicina comparado ao grupo exercitado tratado com veículo.

6.2 ATIVIDADE LOCOMOTORA

Com o objetivo de avaliar a atividade locomotora dos animais, para excluir a possibilidade que os efeitos no tempo de imobilidade no TNF

tenham sido produzidos por uma alteração locomotora, foi realizado o TCA e analisado o parâmetro relacionado ao número de cruzamentos como ilustra a Figura 6. A ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas para o exercício [$F(1,25) = 0,27$ $p > 0,05$], para a administração de rapamicina [$F(1,25) = 1,47$ $p > 0,05$] e para a interação entre exercício e administração de rapamicina [$F(1,25) = 0,18$ $p > 0,05$], revelando, assim, que a atividade locomotora dos animais não foi afetada nos diferentes grupos experimentais.

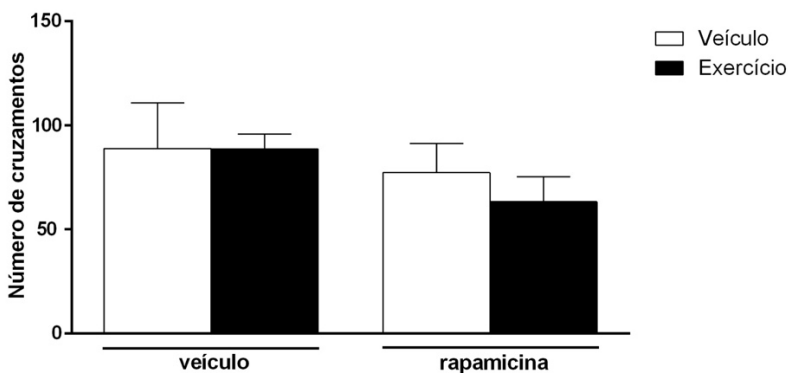


Figura 6. Efeito do exercício físico na atividade locomotora (número de cruzamentos) no TCA em animais exercitados e não exercitados tratados com veículo ou com rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.). Os valores são expressos como média + E.P.M., $n = 7-8$, os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias. Os grupos não apresentaram diferenças significativas.

6.3 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

6.3.1 Imunodeteccção da fosforilação de mTOR no córtex pré-frontal

Utilizando a técnica de *Western Blotting*, foi avaliado se a modulação de mTOR estaria envolvida no efeito tipo-antidepressivo do exercício físico. Os resultados apresentados na Figura 7 mostram o imunoconteúdo da forma fosforilada (Ser²⁴⁴⁸) e total da proteína mTOR no córtex pré-frontal de animais exercitados e veículo com administração de rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) ou salina.

A ANOVA de duas vias não revelou alterações significativas para o exercício [$F(1,16) = 0,03$ $p > 0,05$], administração de rapamicina [$F(1,16) = 3,10$ $p > 0,05$] e para a interação entre exercício e administração de rapamicina [$F(1,16) = 1,04$ $p > 0,05$] na fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) no córtex pré-frontal (p-mTOR/mTOR total).

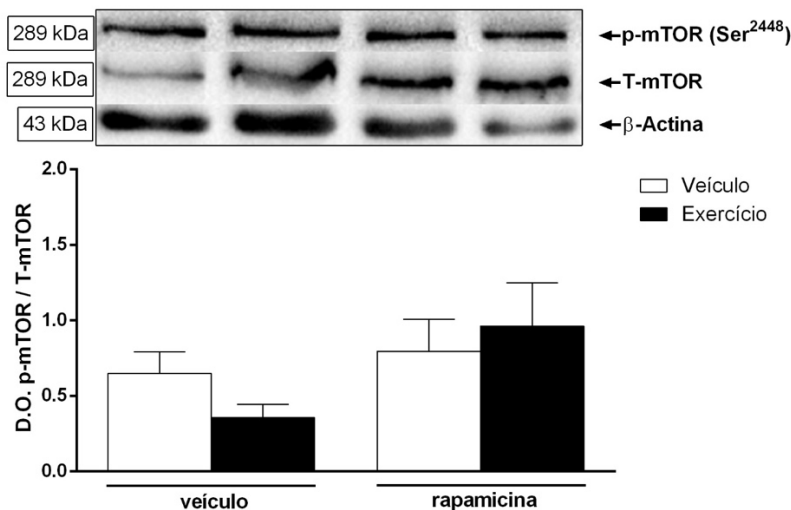


Figura 7. Efeito do exercício físico e da administração de rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) na fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) no córtex pré-frontal. A figura mostra uma imagem representativa da técnica de *Western Blotting* e a quantificação da fosforilação e imunoc conteúdo de mTOR no córtex pré-frontal de animais exercitados e com administração de rapamicina ou veículo. Os dados estão representados pela razão entre a D.O. da proteína fosforilada (p-mTOR) e D.O. da proteína total (mTOR). Os valores são expressos como média + E.P.M., $n = 5$. Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

6.3.2 Imunodeteção da fosforilação de p70S6K no córtex pré-frontal

A ativação de mTORC1 desencadeia a síntese de proteínas sinápticas (LI et al., 2010). Dessa forma, foi investigado se o exercício poderia alterar o imunoc conteúdo de proteínas *downstream* a via mTOR, como a p70S6K. Como ilustrado na Figura 8, a ANOVA de duas vias não apontou diferenças significativas para o exercício [$F(1,23) = 0,28$ $p > 0,05$], administração de rapamicina [$F(1,23) = 0,11$ $p > 0,05$] e para a interação

entre exercício e administração de rapamicina [$F(1,23) = 0,25$ $p > 0,05$] na razão p-p70S6K/p70S6K total. Portanto, não foram encontradas alterações significativas na fosforilação da p70S6K (Thr³⁴⁸) nos diferentes grupos experimentais.

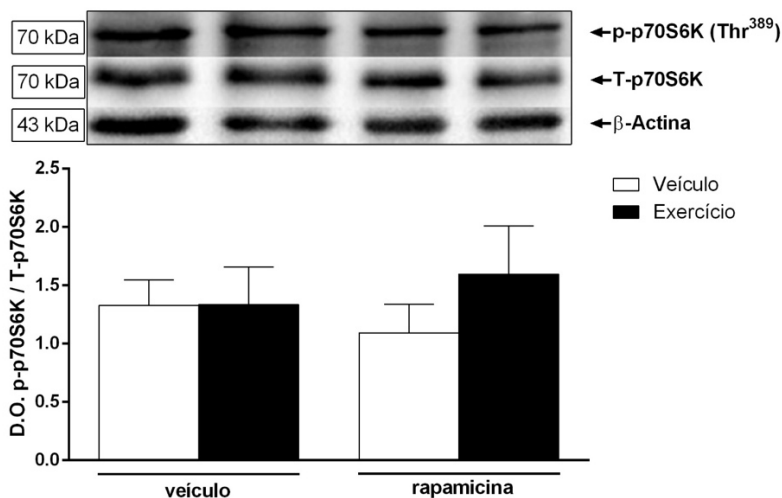


Figura 8. Efeito do exercício físico e da administração de rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) na fosforilação de p70S6K (Thr³⁸⁹) no córtex pré-frontal. A figura mostra uma imagem representativa da técnica de *Western Blotting* e a quantificação da fosforilação e imunoconteúdo de p70S6K no córtex pré-frontal de animais exercitados e com administração de rapamicina ou veículo. Os dados estão representados pela razão entre a D.O. da proteína fosforilada (p-p70S6K) e D.O. da proteína total (T-p70S6K). Os valores estão expressos como média + E.P.M, n = 6-7. Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

7. DISCUSSÃO

O exercício físico proporciona efeitos benéficos no tratamento da depressão (PERRATON et al., 2010). Está estabelecido na literatura que a prática de exercício é um importante aliado no tratamento clínico da depressão (STATHOPOULOU et al., 2006). Além disso, um recente estudo de Lloyd et al. (2017) reporta que a mTOR pode ser um alvo comum dos efeitos benéficos do exercício físico sobre a modulação do humor. Com base nisso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a participação da via mTOR no efeito tipo-antidepressivo induzido pela prática de exercício físico aeróbico. Demonstramos que o exercício físico promove um efeito tipo-antidepressivo nos camundongos no TNF, o qual foi revertido pela administração da rapamicina.

O TNF é um teste preditivo de ação antidepressiva amplamente utilizado e bem validado na literatura (NESTLER et al., 2002). Algumas drogas podem interferir neste teste, na atividade locomotora dos animais, podendo mostrar um resultado falso positivo (STERU et al., 1985), contudo nosso trabalho demonstra que os resultados do TNF não podem ser atribuídos a uma alteração na atividade locomotora, pois não houve diferenças significativas observadas no TCA, validando os resultados obtidos no TNF.

No presente trabalho, foi possível demonstrar que o exercício físico aeróbico de *endurance* promoveu um efeito tipo-antidepressivo nos camundongos, uma vez que diminuiu o tempo de imobilidade em relação ao controle, assim como ocorre em animais tratados com antidepressivos convencionais (PORSOLT et al., 1977). Além disso, estudos na literatura mostram que a atividade física, como a roda de corrida voluntária com duração de 21 dias, reduz o tempo de imobilidade no TNF (DUMAN et al., 2008; CUNHA et al., 2013). Em consonância, em outros testes preditivos de avaliação tipo-depressiva, como no teste de suspensão pela cauda, o mesmo tipo de exercício aeróbico apresentou um efeito tipo-antidepressivo (DUMAN et al., 2008; CUNHA et al., 2013).

A fim de verificar o envolvimento da via mTORC1 no efeito benéfico produzido pelo exercício, foi utilizada a rapamicina (BENJAMIN et al., 2011). Esse composto foi encontrado em bactérias filamentosas que habitam o solo da Ilha de Páscoa - Rapa Nui, do qual dá origem ao nome (Etimologia: Rapa- (Rapa Nui = Ilha de Páscoa), -micina) (VÉZINA et al., 1975). A atividade inibitória da rapamicina sob a mTORC1 ocorre devido a sua associação com a proteína de ligação a FK506 12 (FKBP12), uma vez associados, formam um complexo que interage com o complexo

mTORC1, levando a alterações conformacionais que culminam na diminuição da atividade regulatória responsável pela tradução de proteínas responsáveis pela plasticidade sináptica (BENJAMIN et al., 2011). Nossos resultados mostraram que a administração aguda da rapamicina *per se* não alterou o tempo de imobilidade, mas foi capaz de abolir a redução do tempo de imobilidade no TNF causada pelo exercício físico. Desse modo, o exercício físico produz um comportamento tipo-antidepressivo observado no TNF, possivelmente por meio da ativação da via de sinalização mTOR. De forma semelhante, alguns trabalhos na literatura reportam que a administração de rapamicina preveniu o efeito tipo-antidepressivo de compostos como a guanosina, ácido ascórbico, agmatina, creatina e a cetamina (LI et al., 2010; BETTIO et al., 2012; MORETTI et al., 2014; PAZINI et al., 2016; NEIS et al., 2016).

A ativação de mTOR estimula a fosforilação e ativação de p70S6K cinase e a repressão de 4E-BP1, promovendo a regulação da tradução de proteínas associadas ao funcionamento sináptico, resultando no aumento do número de espinhos dendríticos (LI et al., 2010). Muitos trabalhos mostram uma diminuição da ativação da mTOR em modelos animais de depressão, evidenciando assim a importância desse complexo proteico na depressão (LI et al., 2010; HOWELL et al., 2011; RÉUS et al., 2015). Modelos validados na literatura, como o estresse crônico imprevisível, mimetizam comportamentos e alterações bioquímicas que são observadas no estado depressivo, e neste modelo de comportamento tipo-depressivo, os animais apresentaram redução nos níveis de fosforilação de mTOR e proteínas *downstream* como a fosforilação de p70S6K tanto no córtex pré-frontal (LI et al., 2010; ZHU et al., 2013), como no hipocampo (ZHONG et al., 2014). Em conformidade com estes estudos, o modelo de depressão induzido pela administração de corticosterona também mostrou redução da fosforilação de mTOR e proteínas *downstream*, como a fosforilação de p70S6K e imunoconteúdo de PSD95 no hipocampo de camundongos (PAZINI et al., 2016). Ainda, este mesmo modelo mostrou uma redução da fosforilação de mTOR em cultura de células de neurônios corticais de camundongos (HOWELL et al., 2011). Além disso, a deleção de genes responsáveis pela expressão de mTOR em camundongos gera comportamentos tipo-depressivos semelhantes aos comportamentos gerados pelo estresse crônico imprevisível (ZHONG et al., 2014).

Dados da literatura reportam que compostos antidepressivos que estão envolvidos com a ativação da mTOR, tem um mecanismo de ação rápido, demonstrando aumento na expressão de proteínas sinápticas 60 minutos após o tratamento com esses compostos (MORETTI et al., 2014), ainda tem sido reportado que esse efeito ocorre 120 minutos após

administração de cetamina, sendo responsável pelo aumento da densidade de espinhos dendríticos e sinaptogênese no período de 24 horas (LI et al., 2010). Além disso, a administração aguda de cetamina aumenta os níveis de BDNF e da fosforilação de mTOR no hipocampo de ratos, produzindo um comportamento tipo-antidepressivo no TNF (YANG et al., 2013). De modo semelhante, foi reportado que administração da cetamina em animais além de produzir um efeito tipo-antidepressivo no TNF, produziu também aumento da fosforilação da mTOR no hipocampo e no córtex pré-frontal e aumento dos níveis de BDNF (ZHOU et al., 2014).

Assim, considerando o envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo observado no TNF em nossos dados, foram realizadas análises bioquímicas por *Western Blotting* nas amostras do córtex pré-frontal. Apesar das atividades comportamentais mostrarem uma relação com a mTOR, o imunoconteúdo da forma fosforilada de mTOR e da proteína sináptica p70S6K não apresentaram diferenças significativas. Uma hipótese para este resultado é que a duração da atuação da rapamicina tenha ocorrido rapidamente, assim 30 minutos após a administração deste inibidor não foi um período suficiente para detectar as diferenças nas fosforilações da mTOR e p70S6K. Estudos mostram que o aumento da fosforilação de 4E-BP1, p70S6K e mTOR é transitório, com indução das fosforilações aos 30 e 60 minutos, mas retornam aos níveis basais até duas horas após a administração da cetamina (LI et al., 2010; DUMAN e LI, 2012). Ainda, em estudos utilizando diferentes antagonistas de receptores de NMDA, como a Ro 25-6981, foi observado aumento rápido e transitório da mTORC1 (LI et al., 2010). Dessa forma, sugere-se que o período de tempo possa influenciar diretamente na detecção da fosforilação da mTOR e da p70S6K.

Outra hipótese possível é que o TNF, por ser uma situação aversiva, tenha contribuído a alterações neuroquímicas imediatamente após o teste, e assim tenha influenciado nos resultados bioquímicos. Apesar do TNF ser amplamente utilizado como modelo de teste preditivo de ação tipo-antidepressiva e ser sensível para todas as classes de antidepressivos e terapias não farmacológicas, como eletroconvulsoterapia (PORSOLT et al., 1977; CUNHA et al., 2013), o exercício forçado, como o nado forçado, é associado com mudanças fisiológicas correlacionas ao estresse, com mudanças nos níveis de hormônios como corticotrofina, adrenocorticotrofina e corticosterona plasma (HAYES et al., 2008; CUNHA et al., 2013; LLOYD et al., 2017). Além disso, em estudos em cultura de células, mostram que em estresse oxidativo a via da mTORC1 sofre alterações (HEBERLE et al., 2015) e que fosfatases como a proteína fosfatase 2A (PP2A) sofrem desmetilações e, conseqüentemente, levam a

inibição da via de sinalização de mTORC1 (TANG et al., 2018). Dessa maneira, é possível que após o TNF tenham ocorrido mudanças nas atividades bioquímicas, como na modulação das fosfatases, e estas promoveram a desativação da via mTOR e consequentemente da p70S6K.

Como já mencionado, os efeitos benéficos do exercício físico em relação ao tratamento da depressão podem ser mediados pelo BDNF (ERICKSON et al., 2012; HEYMAN et al., 2012). O BDNF por sua vez poderia ativar os receptores TrkB e desencadear uma cascata de sinalização intracelular que promove a fosforilação e ativação de mTOR (LI et al., 2010). A fosforilação da mTOR resulta na rápida elevação de proteínas *downstream* a via como p70S6K, subsequentemente, leva ao aumento de proteínas sinápticas, como a PSD95 (DUMAN et al., 2012). Nesse sentido, ao investigarmos os níveis de fosforilação de mTOR e p70S6K no córtex pré-frontal, foi possível verificar que não houve diferenças significativas, embora, estudos mostrem déficits da sinalização da mTOR no córtex pré-frontal de pacientes diagnosticados com depressão (DREVETS, 2001; SHELINE, 2003). É possível que os benefícios do exercício físico não influenciem a fosforilação da mTOR e p70S6K nessa estrutura, mas que seu alvo possivelmente seja outra estrutura como o hipocampo.

Um estudo recente de Lloyd e colaboradores (2017) corrobora com nossos achados, no qual mostra que o exercício não mostrou aumento significativo de neurônios positivos a fosforilação da mTOR nas regiões pré-límbicas e infra-límbicas do córtex pré-frontal. Ainda, neste mesmo estudo, o exercício físico voluntário apresentou um efeito mínimo na intensidade de marcação na densitometria sobre a fosforilação de mTOR nas mesmas regiões do córtex pré-frontal (LLOYD et al., 2017). Validando estes dados, o trabalho de Victorino et al. (2017) demonstra que apenas os níveis totais de mTOR foram encontrados elevados no córtex cerebral de ratos jovens exercitados. Em contrapartida aos achados nesta estrutura encefálica, foi reportado aumento do número de neurônios positivos em relação à fosforilação da mTOR nas regiões CA1, CA2, CA3 (*Cornu Ammonis*) do hipocampo e no GD da formação hipocampal tanto para o exercício voluntário quanto para o exercício forçado, e na densitometria, o exercício voluntário apresentou diferenças significativas nas regiões CA1 e CA2, enquanto que ambos tipos de exercícios físicos aumentaram a intensidade de marcação nas regiões CA3 e GD (LLOYD et al., 2017).

Além disso, Victorino e colaboradores (2017) demonstram semelhantemente aos nossos dados, que o exercício físico em ratos jovens não alterou a fosforilação e a porcentagem total de p70S6K no córtex pré-

frontal, enquanto que no hipocampo de animais que apresentaram comportamento tipo-antidepressivo é reportada a fosforilação de p70S6K (MORETTI et al., 2014). Ainda, estudos mostram que o exercício físico estimula a neurogênese hipocampal, levando ao aumento da plasticidade sináptica (VAN PRAAG et al., 1999; ENGESSER-CESAR et al., 2007).

Como já mencionado, os efeitos antidepressivos de ação rápida da cetamina desencadeiam uma cascata de sinalização molecular da via PI3K/Akt e promovem a fosforilação da mTORC1 (LI et al., 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Considerando que os benefícios causados pelo exercício físico podem se dar ao menos em parte pela regulação do complexo mTORC1, é possível presumir que a via que desencadeia a fosforilação deste complexo proteico pode ser através de uma via que é estimulada a longo prazo. Estudos mostram que diferentes classes de antidepressivos, como IRS (inibidores da recaptação de serotonina) e ISRN, aumentam a expressão de RNAm de proteína de ligação ao elemento adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) denominado CREB (NIBUYA et al., 1996). Através do tratamento crônico com antidepressivos, bem como após o exercício físico crônico, CREB pode ser ativado por monoaminas disponibilizadas na fenda sináptica, que se ligam a receptores monoaminérgicos e adrenérgicos (5-HT_{4,6,7} e β AR) que ativam a cascata AMPC/Proteína cinase A (PKA) ou ainda via receptores (5-HT₂ e α AR) que desencadeiam a ativação de proteínas cinases dependentes de Ca²⁺ que por sua vez ativam proteínas cinases dependentes de cálcio/calmodulina (CAMK-II) (TAKAHASHI et al., 1999). A partir disso, CREB regula a transcrição de alvos genéticos que contribuem para os efeitos antidepressivos, como o BDNF (Figura 9) (NIBUYA et al., 1996; TAKAHASHI et al., 1999).

Vale ainda acrescentar que estudos reportam que os níveis de BDNF e TrkB estão elevados no tratamento crônico com antidepressivos (NIBUYA et al., 1996). Ainda, animais com déficit de CREB por manipulação genética não apresentaram alteração na expressão de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo após administração crônica de desipramina, sugerindo que a ativação de CREB é *upstream* ao BDNF nas respostas aos tratamentos antidepressivos (CONTI et al., 2002). Dessa maneira, uma vez havendo BDNF disponível na fenda sináptica, com a consequente estimulação dos receptores TrkB, é provável que consequentemente ocorra a fosforilação da mTORC1, e assim desencadeie a tradução de proteínas sinápticas relacionadas aos efeitos tipo-antidepressivos. Em relação ao exercício físico, um estudo de Cunha et al. (2013) mostrou que os efeitos benéficos da atividade física

observados no TNF são dependentes do aumento do conteúdo de monoaminas na fenda sináptica ou de uma ativação da via de sinalização da PKA e CAMK-II. Portanto, é possível propor com os nossos resultados que o efeito tipo antidepressivo do exercício físico pode ser dependente da fosforilação da mTOR decorrente da ativação do CREB.

Por fim, os resultados desse trabalho sugerem que os mecanismos envolvendo o efeito tipo-antidepressivo do exercício físico de *endurance* pode envolver a ativação da via de sinalização mTOR, contudo em outra estrutura límbica, como o hipocampo e até mesmo pode ser ativado por outras vias relacionadas ao tratamento crônico que convergem a via da mTOR. Dessa maneira, mais estudos são necessários para determinar os mecanismos envolvendo os efeitos benéficos do exercício físico no tratamento da depressão.

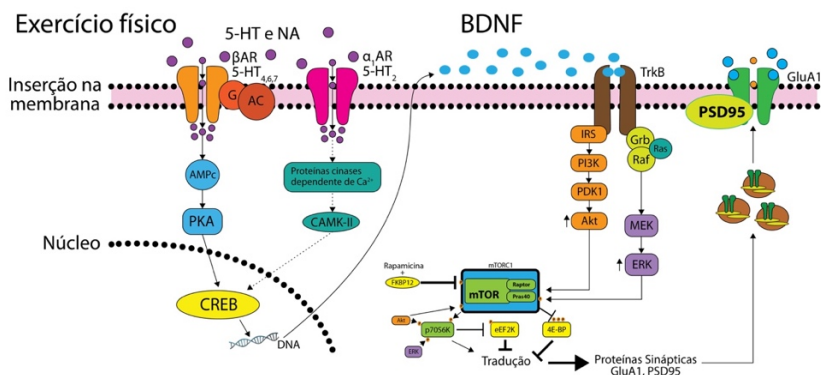


Figura 9. Possível mecanismo de ação tipo-antidepressiva em resposta ao exercício físico crônico. Esta figura ilustra os possíveis mecanismos moleculares do exercício físico, os quais são bem reportados como alvos antidepressivos usados na clínica. A partir do aumento dos níveis de monoaminas na fenda sináptica, estas estimulam os receptores monoaminérgicos e adrenérgicos (5-HT_{4,6,7} e βAR) que estão acoplados à proteína G estimulatória juntamente com adenilil ciclase (AC), aumentando os níveis de AMPc e consequentemente PKA. Esta última, leva ao aumento da expressão de CREB. Alvos genéticos do CREB, como por exemplo o BDNF, são regulados por essa cascata e liberados na fenda sináptica. Adicionalmente, a regulação de CREB pode se dar por receptores (5-HT₂ e αAR) que estimulam proteínas cinases dependentes de Ca²⁺ que por sua vez ativam proteínas cinases dependentes de cálcio/calmodulina (CAMK-II). O aumento de BDNF na fenda sináptica, consequentemente, estimula os receptores TrkB que ativam a via PI3K/Akt e MEK/ERK, que fosforila o complexo mTORC1. A partir da ativação deste complexo, ocorre a fosforilação de proteínas que desempenham papel importante na síntese de proteínas sinápticas. Fonte: Autor.

8. CONCLUSÃO

O exercício físico de *endurance per se* é capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TNF sem causar prejuízos locomotores como observado no TCA, indicando um comportamento tipo-antidepressivo nos camundongos *Swiss* fêmeas. Adicionalmente, a rapamicina foi capaz de reverter o comportamento tipo-antidepressivo causado pelo exercício físico, sugerindo que a ativação de mTOR está envolvida no efeito tipo-antidepressivo deste protocolo de exercício físico.

Nas análises bioquímicas por *Western Blotting*, não foram detectadas diferenças significativas no imunoconteúdo da fosforilação da mTOR, assim como não houve diferenças no imunoconteúdo da fosforilação de p70S6K, ambos no córtex pré-frontal. Esses resultados demonstram que possivelmente: a) as fosforilações da mTOR e p70S6K são transitórias, então, é possível que o período de ação da rapamicina tenha sido insuficiente para obter diferenças significativas; b) o TNF, por ser um teste de desespero comportamental, tenha influenciado nos níveis de fosforilações da mTOR, bem como nas fosforilações da p70S6K; c) ainda, é possível presumir que o benefício do exercício físico nos efeitos tipo-antidepressivos pode ocorrer através da via da mTOR, contudo esta via pode ser estimulada e ativada em outras estruturas límbicas, como o hipocampo, o qual está intimamente associado com a depressão (DREVETS, 2001); d) a cascata de sinalização da mTOR pode ser estimulada através de vias bioquímicas estimuladas em tratamentos crônicos com antidepressivos, como as vias que resultam em CREB. Portanto, este trabalho permite propor que a via da mTOR possa estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo causado pelo exercício físico de *endurance*, embora sejam necessários mais trabalhos mostrando os efeitos comportamentais e bioquímicos dos mecanismos envolvidos na presença deste estímulo.

9. PERSPECTIVAS

- Avaliar as alterações na expressão de receptores TrkB, e proteínas como a PSD95, p70S6K e níveis de BDNF no hipocampo dos animais submetidos ao exercício físico de *endurance*;
- Avaliar as alterações na expressão de proteínas como a PKA e a CAMK-II, assim como avaliar RNAm de CREB no hipocampo dos animais submetidos ao exercício físico de *endurance*;
- Verificar a sinaptogênese hipocampal dos animais treinados.

REFERÊNCIAS

ADLARD, P. A. et al. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. **Neurosci Lett**, v. 363, n. 1, p. 43-8, Jun 2004. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157993> >.

AKSU, I. et al. Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF and BDNF levels of rat pups in early and late periods of life. **Neurosci Lett**, v. 516, n. 2, p. 221-5, May 2012. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503727> >.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013. American Psychiatric Association. (2013). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)**. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

ARCHER, T.; JOSEFSSON, T.; LINDWALL, M. Effects of physical exercise on depressive symptoms and biomarkers in depression. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 10, p. 1640-53, 2014. ISSN 1996-3181. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470398> >.

BAXTER, A. J. et al. Global epidemiology of mental disorders: what are we missing? **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65514, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826081> >.

BENJAMIN, D. et al. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 11, p. 868-80, Oct 2011. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037041> >.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351-4, Feb 2000. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686270> >.

BERNARDI, C. et al. Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats. **Neural Plast**, v. 2013, p. 709732, 2013. ISSN 1687-5443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401802> >.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, Feb 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429123> >.

BETTIO, L. E. et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**, v. 234, n. 2, p. 137-48, Oct 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743004> >.

BLUMENTHAL, J. A. et al. Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder. **Psychosom Med**, v. 69, n. 7, p. 587-96, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 1534-7796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17846259> >.

BROCARDO, P. E. S. et al. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 598, n. 1-3, p. 37-42, Nov 2008. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789921> >.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 126-31, 1985 Mar-Apr 1985. ISSN 0033-3549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3920711> >.

CHODZKO-ZAJKO, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 7, p. 1510-30, Jul 2009. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516148> >.

CONTI, A. C. et al. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to

antidepressant drugs. **J Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 3262-8, Apr 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943827> >.

CUNHA, M. P. et al. Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 11, p. 1489-501, Nov 2012. ISSN 1461-7285. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674968> >.

CUNHA, M. P. et al. The antidepressant-like effect of physical activity on a voluntary running wheel. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 5, p. 851-9, May 2013. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190594> >.

DALEY, A. Exercise and depression: a review of reviews. **J Clin Psychol Med Settings**, v. 15, n. 2, p. 140-7, Jun 2008. ISSN 1573-3572. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104978> >.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 2, p. 240-9, Apr 2001. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301246> >.

DUMAN, C. H. et al. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Res**, v. 1199, p. 148-58, Mar 2008. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267317> >.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, Sep 2012. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826346> >.

DUMAN, R. S. et al. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 35-41, Jan 2012. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907221> >.

DUMAN, R. S. et al. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 732-9, Oct 2000. ISSN 0006-3223. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063970> >.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, Jun 2006. ISSN 0006-3223. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631126> >.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 47-56, Jan 2012. ISSN 1878-108X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217452> >.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-51, May 2004. ISSN 0278-5846. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093950> >.

ENGESSER-CESAR, C.; ANDERSON, A. J.; COTMAN, C. W. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 1033-44, Feb 2007. ISSN 0306-4522. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137724> >.

ERICKSON, K. I.; MILLER, D. L.; ROECKLEIN, K. A. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. **Neuroscientist**, v. 18, n. 1, p. 82-97, Feb 2012. ISSN 1089-4098. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531985> >.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 3017-22, Feb 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282661> >.

FEBBRAIO, M. A. Exercise metabolism in 2016: Health benefits of exercise - more than meets the eye! **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 2, p. 72-74, 02 2017. ISSN 1759-5037. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051119> >.

FOSTER, P. P.; ROSENBLATT, K. P.; KULJIŠ, R. O. Exercise-induced cognitive plasticity, implications for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Front Neurol**, v. 2, p. 28, 2011. ISSN 1664-2295. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602910> >.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **N Engl J Med**, v. 251, n. 25, p. 1006-8, Dec 1954. ISSN 0028-4793. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13214379> >.

GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 24, p. 35-71, 1996. ISSN 0091-6331. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744246> >.

GONÇALVES, J. T.; SCHAFER, S. T.; GAGE, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. **Cell**, v. 167, n. 4, p. 897-914, Nov 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27814520> >.

GRIFFIN, É. et al. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 934-41, Oct 2011. ISSN 1873-507X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722657> >.

HALL, C. S. Emotional behaviour in the rat: III The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J. Comp. Psychol.** v. 22, n. 3, p. 345–352, 1936. Disponível em:
 <<http://psycnet.apa.org/doiLanding?doi=10.1037%2Fh0059253>>

HAYES, K. et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. **Acta Neuropathol**, v. 115, n. 3, p. 289-96, Mar 2008. ISSN 0001-6322. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18210137> >.

HEBERLE, A. M. et al. Molecular mechanisms of mTOR regulation by stress. **Mol Cell Oncol**, v. 2, n. 2, p. e970489, 2015 Apr-Jun 2015. ISSN

2372-3556. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308421> >.

HEYMAN, E. et al. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 6, p. 844-51, Jun 2012. ISSN 1873-3360. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029953> >.

HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. **Trends Neurosci**, v. 33, n. 2, p. 67-75, Feb 2010. ISSN 1878-108X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963289> >.

HOWELL, K. R.; KUTIYANAWALLA, A.; PILLAI, A. Long-term continuous corticosterone treatment decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20198, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647420> >.

HÖTTING, K. et al. The Effects of Acute Physical Exercise on Memory, Peripheral BDNF, and Cortisol in Young Adults. **Neural Plast**, v. 2016, p. 6860573, 2016. ISSN 1687-5443. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27437149> >.

INOUE, K. et al. Long-Term Mild, rather than Intense, Exercise Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis and Greatly Changes the Transcriptomic Profile of the Hippocampus. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128720, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061528> >.

JOYNER, M. J.; COYLE, E. F. Endurance exercise performance: the physiology of champions. **J Physiol**, v. 586, n. 1, p. 35-44, Jan 2008. ISSN 0022-3751. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901124> >.

KASTER, M. P. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-26, Jan 2012. ISSN 1873-7064. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21867719> >.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923511> >.

LAWSON, E. C. et al. Aerobic exercise protects retinal function and structure from light-induced retinal degeneration. **J Neurosci**, v. 34, n. 7, p. 2406-12, Feb 2014. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523530> >.

LEAL, R. B. et al. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 178, n. 1, p. 44-51, Jan 2002. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781079> >.

LEE, S. et al. Involvement of BDNF/ERK signaling in spontaneous recovery from trimethyltin-induced hippocampal neurotoxicity in mice. **Brain Res Bull**, v. 121, p. 48-58, Mar 2016. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772626> >.

LETT, H. S.; DAVIDSON, J.; BLUMENTHAL, J. A. Nonpharmacologic treatments for depression in patients with coronary heart disease. **Psychosom Med**, v. 67 Suppl 1, p. S58-62, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1534-7796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953803> >.

LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959-64, Aug 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724638> >.

LIU, P. Z.; NUSSLOCK, R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. **Front Neurosci**, v. 12, p. 52, 2018. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467613> >.

LLOYD, B. A. et al. Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. **Behav Brain Res**, v. 323, p. 56-67, Apr 2017. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130174> >.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol Cell**, v. 10, n. 3, p. 457-68, Sep 2002. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408816> >.

LOFTIS, J. M.; HUCKANS, M.; MORASCO, B. J. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. **Neurobiol Dis**, v. 37, n. 3, p. 519-33, Mar 2010. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944762> >.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, n. 24, p. 9104-10, Dec 2000. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124987> >.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, Apr 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736372> >.

MORETTI, M. et al. Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, Jan 2014. ISSN 1879-1379. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24209999> >.

MORICI, G. et al. Endurance training: is it bad for you? **Breathe (Sheff)**, v. 12, n. 2, p. 140-7, Jun 2016. ISSN 1810-6838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27408632> >.

MUSUMECI, G. et al. Changes in serotonin (5-HT) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in frontal cortex and hippocampus of aged rat treated with high tryptophan diet. **Brain Res Bull**, v. 119, n. Pt A, p. 12-8, Oct 2015. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26444078> >.

NEIS, V. B. et al. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 6, p. 959-71, 06 2016. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27061850> >.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**, v. 41, n. 3-4, p. 189-206, 2007 Apr-Jun 2007. ISSN 0022-3956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870212> >.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar 2002. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931738> >.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-9, Jun 2006. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566899> >.

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 2365-72, Apr 1996. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601816> >.

OLESEN, J. et al. The economic cost of brain disorders in Europe. **Eur J Neurol**, v. 19, n. 1, p. 155-62, Jan 2012. ISSN 1468-1331. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22175760> >.

OLIVEIRA, C. S. et al. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 3-4, p. 355-62, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280691> >.

OSIKOWICZ, M.; MIKA, J.; PRZEWLOCKA, B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. **Exp Physiol**, v. 98, n. 2, p. 372-84, Feb 2013. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002244> >.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16065, 09 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27629598> >.

PARDON, M. C. Therapeutic potential of some stress mediators in early Alzheimer's disease. **Exp Gerontol**, v. 46, n. 2-3, p. 170-3, 2011 Feb-Mar 2011. ISSN 1873-6815. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870017> >.

PATE, R. R.; KRISKA, A. Physiological basis of the sex difference in cardiorespiratory endurance. **Sports Med**, v. 1, n. 2, p. 87-98, 1984 Mar-Apr 1984. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6567230> >.

PAZINI, F. L. et al. Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 10, p. 6818-6834, 12 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26660117> >.

PERRATON, L. G.; KUMAR, S.; MACHOTKA, Z. Exercise parameters in the treatment of clinical depression: a systematic review of randomized controlled trials. **J Eval Clin Pract**, v. 16, n. 3, p. 597-604, Jun 2010. ISSN 1365-2753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20039997> >.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, Dec 1977. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/603028> >.

PIETRELLI, A. et al. Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats. **Neurobiol Learn Mem**, May 2018. ISSN 1095-9564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29800645> >.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, Oct 1977. ISSN 0003-9780. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/596982> >.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; et al. **Neuroscience**. 4ed.

Porto Alegre:Artmed;2010.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 20, n. 8, p. 1107-30, Aug 2011. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682663> >.

RÉUS, G. Z. et al. Glutamatergic NMDA Receptor as Therapeutic Target for Depression. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 103, p. 169-202, 2016. ISSN 1876-1623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26920690> >.

RODRIGUES, A. L. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol**, v. 79, n. 3, p. 150-6, Sep 1996. ISSN 0901-9928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884874> >.

RUSSO-NEUSTADT, A.; BEARD, R. C.; COTMAN, C. W. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 5, p. 679-82, Nov 1999. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516964> >.

RUSSO-NEUSTADT, A. A. et al. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 12, p. 2189-99, Dec 2004. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199375> >

SAHLIN, K. et al. Prior heavy exercise eliminates VO2 slow component and reduces efficiency during submaximal exercise in humans. **J Physiol**, v. 564, n. Pt 3, p. 765-73, May 2005. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746165> >.

SEEDAT, S. et al. Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 785-95, Jul 2009. ISSN

1538-3636. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581570> >.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, Nov 1965. ISSN 0002-953X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5319766> >.

SHELINE, Y. I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 338-52, Aug 2003. ISSN 0006-3223. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12893109> >.

SHELTON, C.; SHRYOCK, M. Effectiveness of communication/interaction strategies with patients who have neurological injuries in a rehabilitation setting. **Brain Inj**, v. 21, n. 12, p. 1259-66, Nov 2007. ISSN 0269-9052. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18236201> >.

SHEN, Y. et al. Acute exercise regulates adipogenic gene expression in white adipose tissue. **Biol Sport**, v. 33, n. 4, p. 381-391, Dec 2016. ISSN 0860-021X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28090143> >.

SIDDIQUI, N. I.; NESSA, A.; HOSSAIN, M. A. Regular physical exercise: way to healthy life. **Mymensingh Med J**, v. 19, n. 1, p. 154-8, Jan 2010. ISSN 1022-4742. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20046192> >.

SILVA, M. T. et al. Prevalence of depression morbidity among Brazilian adults: a systematic review and meta-analysis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 36, n. 3, p. 262-70, Sep 2014. ISSN 1809-452X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119639> >.

SO, J. H. et al. Intense Exercise Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis But Not Spatial Discrimination. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 13, 2017. ISSN 1662-5102. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28197080> >.

STATHOPOULOU G. et al. Exercise interventions for mental health: a quantitative and qualitative review. 2006. In: Database of Abstracts of

Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]. York (UK): Centre for Reviews and Dissemination (UK).

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology** (Berl), v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

SUN, L. N.; QI, J. S.; GAO, R. Physical Exercise Reserved Amyloid-beta Induced Brain Dysfunctions by Regulating Hippocampal Neurogenesis and Inflammatory Response via MAPK Signaling. **Brain Res**, May 2018. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29729254> >.

TAKAHASHI, M. et al. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP-specific phosphodiesterase 4A and 4B isoforms. **J Neurosci**, v. 19, n. 2, p. 610-8, Jan 1999. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880581> >.

TANG, S. et al. H. **Cell Biol Int**, May 2018. ISSN 1095-8355. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29752834> >.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195220> >.

VICTORINO, A. B. et al. Aerobic exercise in adolescence results in an increase of neuronal and non-neuronal cells and in mTOR overexpression in the cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, v. 361, p. 108-115, Oct 2017. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28802917> >.

VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 28, n. 10, p. 721-6, Oct 1975. ISSN 0021-8820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1102508> >.

WHIPP, B. J. The slow component of O₂ uptake kinetics during heavy exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 26, n. 11, p. 1319-26, Nov 1994.

ISSN 0195-9131. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7741865> >.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-51, May 2001. ISSN 1471-003X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331918> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**. 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <
<http://www.who.int/iris/handle/10665/254610> >.

YANG, C. et al. Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. **Ups J Med Sci**, v. 118, n. 1, p. 3-8, Mar 2013. ISSN 2000-1967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970723> >.

ZHONG, P. et al. Monoacylglycerol lipase inhibition blocks chronic stress-induced depressive-like behaviors via activation of mTOR signaling. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 7, p. 1763-76, Jun 2014. ISSN 1740-634X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476943> >.

ZHOU, W. et al. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **Eur Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 419-23, Sep 2014. ISSN 1778-3585. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24321772> >.

ZHU, W. L. et al. Glycine site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist 7-CTKA produces rapid antidepressant-like effects in male rats. **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, n. 5, p. 306-16, Sep 2013. ISSN 1488-2434. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611177> >.